

201121003A

厚生労働科学研究費補助金
腎疾患対策研究事業

**糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための
評価法の開発 (H21-腎疾患-一般-002)**

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 隆 志

平成24 (2012) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発…………… 1
和田 隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学

II. 全体研究報告

【全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用】

1. 糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用に関する研究…………… 29
和田 隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学
2. 糖尿病性腎症での高カルシウム尿症における α -Klotho 蛋白の意義に関する研究…………… 38
岩野 正之 奈良県立医科大学第1内科
浅井 修 奈良県立医科大学第1内科
中谷 公彦 奈良県立医科大学第1内科
3. 腎臓病総合レジストリー（糖尿病性腎症）の構築とその解析：高齢者糖尿病性腎症…………… 40
横山 仁 金沢医科大学医学部腎臓内科学

III. 分担研究報告

【分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析】

1. 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析に関する研究…………… 45
羽田 勝計 旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野
2. 糖尿病性腎症の体液貯留に関する研究…………… 51
草野 英二 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門
増田 貴博 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門
武藤 重明 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門

3. 「糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発」に関する研究・・・ 53
 佐藤 博亮 福島県立医科大学腎臓高血圧糖尿病内分泌代謝内科学講座
 渡辺 毅 福島県立医科大学腎臓高血圧糖尿病内分泌代謝内科学講座
4. 糖尿病性腎症例を対象とした予後，合併症，治療に関する観察研究・・・・・・・ 57
 鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター
5. 糖尿病性腎症例を対象とした予後，合併症，治療に関する観察研究・・・・・・・ 59
 槇野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学
6. 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発・・・・・・・ 62
 荒木 信一 滋賀医科大学糖尿病・腎臓・神経内科
7. 糖尿病性腎症の地域格差に関する研究・・・・・・・ 65
 井関 邦敏 琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部
8. 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発・・・・・・・ 69
 二宮 利治 九州大学病院腎高血圧脳血管内科
9. 「糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析」に関する研究・・・・・・・ 71
 守屋 達美 北里大学医学部内分泌代謝内科学

【分科会：糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発】

1. 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発に関する研究・・・ 73
 湯澤 由紀夫 藤田保健衛生大学医学部腎内科学
2. 糖尿病性腎症の病態解明と評価のためのバイオマーカー開発に関する研究・・・・・・・ 83
 安部 秀斉 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部病態情報医学講座腎臓内科学
3. 糖尿病性腎症のバイオマーカーに関する研究・・・・・・・ 85
 篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学
4. 高脂血症による腎障害進展に着目した糖尿病性腎症の新規バイオマーカーの探索・・・・・・・ 89
 森 潔 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科
 向山 政志 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科
 栗原 孝成 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】

1. “AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性”に関する研究	93
奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門	
深水 圭 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門	
2. 糖尿病性腎症の新規治療法の開発に関する研究	96
古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科学	
3. 糖尿病性腎症に対する GLP-1 受容体作動薬の効果の検討	98
四方 賢一 岡山大学病院新医療研究開発センター	
4. 糖尿病性腎症の進展に対するケモカイン受容体阻害薬の検討	102
和田 隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学	
原 章規 金沢大学附属病院腎臓内科・救急部	
IV.研究成果の刊行に関する一覧	107
V.研究成果の刊行物・別刷	115
VI.プログラム・抄録集	515

総括研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）
総括研究報告書

研究代表者

和田 隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学

研究分担者

安部 秀斉 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部病態情報医学講座腎臓内科学
奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門
草野 英二 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門
古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科学
佐藤 博亮 福島県立医科大学腎臓高血圧・糖尿病内分泌代謝内科学講座
鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター
篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学
羽田 勝計 旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野
槇野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学
湯澤 由紀夫 藤田保健衛生大学医学部腎内科学

研究協力者

荒木 信一 滋賀医科大学糖尿病・腎臓・神経内科
井関 邦敏 琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部
岩野 正之 奈良県立医科大学第一内科学
四方 賢一 岡山大学病院新医療研究開発センター
中村 裕之 金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学
二宮 利治 九州大学病院 腎・高血圧・脳血管内科
馬場園 哲也 東京女子医科大学糖尿病センター
原 章規 金沢大学附属病院救急部
原 茂子 虎の門病院腎センター
深水 圭 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門
古市 賢吾 金沢大学附属病院血液浄化療法部
森 潔 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科
守屋 達美 北里大学内分泌代謝内科学
山本 格 新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設構造病理学分野
横山 仁 金沢医科大学医学部腎臓内科学
横山 宏樹 自由が丘横山内科クリニック

研究要旨

本研究では、糖尿病性腎症の予後改善にむけて、1) 糖尿病性腎症レジストリーによるデータベース構築と拡充、2) 病期分類改訂にむけた提言案策定、3) バイオマーカー、新規治療法開発の基盤研究を行った。本研究の全体研究として、尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーを構築し、本年度もその拡充を進めてきた。本レジストリー（JDN-CS）は日本腎臓学会が推進している腎臓病総合レジストリーシステムと関連し、

平成23年12月末現在、420例（男性269例、女性151例、平均年齢65.4±10.7歳）が登録された。また、尿検体収集例は228例であった。さらに214例の経時データが登録された。今後も症例登録、データの集積を継続し、本邦の糖尿病性腎症の病態解析、予後評価を行う予定である。また、本年度は、レジストリー登録例の尿検体を、バイオマーカーの validation に用いた検討も行った。

さらに、糖尿病性腎症の病態・予後を反映する病期分類を目指し、糖尿病性腎症の病期分類の改訂にむけた提言案を示した。これは、1. 多施設共同による事前登録前向き研究、2. メタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例の予後解析を根拠として作成した。アルブミン・蛋白尿ならびに腎機能を病期分類の基本とすえ、腎予後、心血管病変、総死亡を反映する提言案となった。加えて、特異的な早期診断マーカーの開発、病理診断等今後解決すべき課題を提言した。

本研究では、糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発の基盤研究を行った。本年度は、CCN2, Collagen IV, Angiotensinogen (AGT), MCP-1, L-FABP を最終候補として選定し、レジストリーの収集尿検体も用いてパネルモデルを検討した。さらに、末梢血トランスクリプトーム解析、尿中エクソゾーム解析、尿のメタボローム解析も進行し有力なシーズが開発されている。加えて、糖尿病性腎症の新規治療法の開発も重要な課題である。カロリー制限模倣薬、ケモカイン受容体阻害薬、AGEs-DNA アプタマーおよび GLP-1 受容体アゴニストの解析が進行している。本年度においては、各治療法の基礎的研究の進展に加えて、一部の治療法に関しては臨床における介入試験が開始された。

A. 研究目的

本邦における糖尿病性腎症による透析導入が増加している。この糖尿病とその合併症である糖尿病性腎症の克服は国民の強い願いであり、医学的、社会的、医療経済に加えて厚生労働行政の喫緊の課題である。本研究の目的は、1) 糖尿病性腎症レジストリーによるデータベース構築、2) 病期分類改訂にむけた提言、3) バイオマーカー、新規治療法開発の基盤研究を行うことである。そして、最終的に糖尿病性腎症の予後改善を目指す。本研究班の3年目に当たる平成23年度は、研究分担者10名、研究協力者16名とともに、日本腎臓学会、厚生労働省関連研究班と協調し、データベース推進、糖尿病性腎症病期分類の改訂にむけた提言案を示す事を目的とした。

全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

糖尿病性腎症の克服にむけて、疫学、治療および予後を把握する必要がある。しかしながら、本邦では、糖尿病性腎症例の実態把握のための症例登録システム（レジス

トリー）が整備されておらず、病態の解析や予後調査は未だ不十分である。この課題を解決するために、本研究班では、腎症前期から顕性腎症にいたる幅広い病期の糖尿病性腎症例を対象とし、尿検体の保存を含めて、長期経過観察可能なレジストリーシステムを構築する。そして、病態解明、予後改善や有効な治療法開発につながる本邦のコホートを作成することを目的とした。

分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

本分科会の目的は、より臨床の病態を反映する糖尿病性腎症病期分類への改訂にむけた具体的な提言案を提示することである。

本分科会の研究目的を達するために過去2年間に、1. 既存のコホートをを用いた多施設共同による事前登録前向き研究、2. 既報論文によるメタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例の予後とその規定因子の検討を行ってきた。特に臨床的に頻度が高く、CKD分類と糖尿病性腎症

病期分類から病態・予後が十分理解されていない下記の症例を中心に腎予後、総死亡、心血管イベントの解析を行ってきた。

- ① GFR60 未満 (CKD ステージ分類 3 以上) で蛋白尿陰性及び微量アルブミン尿陽性症例
- ② GFR60 以上 (CKD ステージ分類 1、2) で顕性腎症例

平成23年度は最終年度であるため、これらのデータを元に、具体的な提言案をまとめる事を目的とした。

分科会：糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発

1) 分科会全体研究

「糖尿病性腎症に関する「より早期の診断」・「予後推定」・「治療効果判定」・「新たな病期分類を可能」とするバイオマーカーの探索、及びパネル化モデルの提言」を最終目標とする。

2) 個別研究目的

①メタボローム解析；オミクス解析法のひとつであるメタボローム解析は、生体試料中の全代謝物（メタボローム）の変化をバイアスをかけずに一斉測定する網羅的解析手法である。キャピラリー電気泳動装置＋質量分析機 (CE+MS) による細胞内の全イオン性代謝物（～1k Da）を網羅的かつ高速に直接定量する手法を用い、尿サンプルを用いて糖尿病性腎症の病態を反映するバイオマーカーの網羅的解析を行う。

②エクソゾーム解析；糸球体上皮細胞であるポドサイトは高度に機能が分化しており、増殖能を有さないため、種々のストレスを受けると細胞機能が低下し、不可逆的な腎機能低下へ至る。この、ポドサイト内における障害を非侵襲的かつ継続的に評価するマーカーを同定し、ポドサイト障害の分子病態の解析とともに、侵襲性の高い腎生検によらない、診断かつ予後予測に有用なバイオマーカー測定法を樹立する。

③血液を用いた糖尿病病態診断の試み；近年、2型糖尿病・肥満症は、生体ストレス・炎症や過栄養、多臓器由来液性因子など多

因子が体内において複雑なネットワークを形成して発症することが認識されてきた。なかでも肝臓は、糖・蛋白・脂質代謝の司令塔として、これらの多因子を感じとり、遺伝子発現をダイナミックに変化させることで生体の恒常性を維持している。肥満症、糖尿病、およびそれらの合併症である動脈硬化、癌などの、過栄養が関与する症候群に肝臓の機能破綻とそれに伴うインスリン抵抗性が大きく関与している可能性がある。

本研究では、PBMC のおよび肝臓に発現する遺伝子発現プロファイルをから糖尿病に関連する遺伝子の検討を行う。

分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発

本分科会では、4つの異なる新規糖尿病性腎症治療薬の効果ならびに今後の臨床応用の可能性について検討した。

①カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果

②骨髄由来細胞に作用するケモカイン受容体阻害薬の検討

③糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討

④AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性

である。具体的には、以下の目的で研究を行った。

①カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果

抗老化分子として注目されている SIRT1 に着目し、SIRT1 を調節しうるレスベラトロールによる腎障害進展抑制作用を検討した。

②骨髄由来細胞に作用するケモカイン受容体阻害薬の検討

臓器線維化と密接に関連する骨髄由来細胞、CD45/typeI collagen (Col1) 二重陽性細胞がケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎線維化に関与することから、CCR2 阻害薬を使用し、CD45/ Col1 二重陽性細胞の制御による腎症の治療効果を検討した。糖尿病性腎症の成因に炎症が関

与することが判明しつつある。病理学的には単球・マクロファージに代表される炎症・免疫担当細胞の浸潤を認める。一方、臓器線維化と密接に関連する新規細胞成分として骨髄由来細胞、CD45+/Col1+細胞が注目されている。CD45+/Col1+細胞はケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎に浸潤し、マウス腎線維化に重要な役割を果たすことが報告されている。また、ヒト糖尿病性腎症の腎生検組織においてもCD45+/Col1+細胞を認め、その細胞数は腎機能および間質線維化と相関することから、同細胞の線維化への関与が示唆されている。ケモカインの代表であるMCP-1はその受容体CCR2を介して炎症・免疫担当細胞の浸潤に関与する重要な腎臓病の進展因子である。これまでの検討から、CD45+/Col1+細胞がマウス1型糖尿病性腎症モデルの腎間質に存在することが確認された。加えて、CCR2阻害によりCD45+/Col1+細胞数が減少するとともに、腎線維化およびアルブミン尿が改善することが判明している。

一方、ヒト末梢血より分離・培養したCD45+/Col1+細胞を高糖培養した結果、1型コラーゲンおよびTGF- β 1のmRNA発現が濃度および時間依存性に亢進することが判明した。また、高糖下のCD45/Col1二重陽性細胞にはCCR2が発現することが確認された。さらに、高糖下のMCP-1刺激により、1型コラーゲンおよびTGF- β 1のmRNA発現はさらに亢進した。本年度は、CCR2を介したCD45+/Col1+細胞の制御による2型糖尿病性腎症の治療の可能性を検討した。

③糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討

血管壁に起こる微小な慢性炎症(microinflammation)が糖尿病性腎症の進展過程に重要な役割を果たしていることを明らかになってきた。酸化ストレスはmicroinflammationの原因の一つであり、腎症の成因に深く関与していると考えられる。メタロチオネイン(MT)は、1957

年にMargoshesとValleeによってウマの腎臓からカドミウムを結合するタンパク質として発見された、金属結合性のタンパク質である。分子中に最大7-12個の重金属イオンを結合できることから、必須微量元素の恒常性維持あるいは重金属元素の解毒の役割を果たしていると考えられている。また、抗酸化性タンパク質としても注目されている。MT-Iから-IVまでの4種のアイソフォームが存在し、MT-IおよびMT-IIはほとんどの臓器で発現しているが、特に肝臓、腎臓、小腸および膵臓で多く発現している。現在までに、糖尿病性腎症におけるMTの発現パターンや詳細な局在は未だ報告がない。本研究では、抗酸化作用を示すメタロチオネイン(MT)が、腎症の進展過程に果たす役割を検討した。

④AGEs-DNA aptamerによる糖尿病性腎症進展抑制の可能性

Advanced glycation end products (AGEs)は、糖尿病における長期間の高血糖状態において、糖と蛋白が非酵素的に反応し生成される糖化最終産物である。近年、AGEsの蓄積や生物化学的反応が糖尿病性腎症の発症、進展に重要な働きを担っていることが報告されている。近年、我々はAGEsと特異的に、かつ強力に結合するAGEs-DNA aptamerを作製した(Microvas Res 2007, 74, 65-69)。本研究の目的は、AGEs-DNA aptamerを糖尿病モデル動物に投与して、アプタマーの糖尿病性腎症への有効性を検討し、将来の臨床応用への可能性を模索することである。

B. 研究方法

本研究は班全体で行う全体研究と、研究班の目標にそった分担研究により構成される。

全体研究

糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

平成21年度から尿検体収集を伴う糖尿病性腎症レジストリー(Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study (JDN-CS))を

構築・運用し拡充を図っている。登録例のデータを長期に利用可能なデータベースとして整備する。本レジストリーは日本腎臓学会腎臓病総合レジストリーと密接に連携する。本レジストリーの特色は、尿検体の収集ならびに腎生検例が含まれることである。この臨床、病理所見、尿検体を用いて、平成21年度以降、データベースを拡充し、事前登録前向き研究、バイオマーカー解析と連関し、本邦の糖尿病性腎症の病態、予後を臨床病理学的に検討する。なお、対象は、20歳以上で腎症発症前の糖尿病症例ならびに糖尿病性腎症第1期から第5期の症例とした。

検討項目を以下に記す。

1) 登録時および定期的観察点(半年から1年毎)において収集するデータ
患者年齢(生年)、性別、糖尿病歴(登録時)、腎生検日、身長、体重、BMI、血圧、網膜症、血圧、ヘモグロビン値、血清クレアチニン値、血清総蛋白値、血清アルブミン値、血糖値、ヘモグロビンA1c値、総コレステロール値、LDLコレステロール値、HDLコレステロール値、中性脂肪値、尿クレアチニン値、尿蛋白値、尿アルブミン値、尿蛋白/尿クレアチニン比、尿アルブミン/尿クレアチニン比とした。なお、定期観察点のデータは、前後2週間以内のデータを登録可能とした。

2) 治療に関して収集するデータ

糖尿病治療薬、降圧薬、脂質異常症治療薬の投与の有無および種類

3) 生活習慣に関して収集するデータ
喫煙状況

4) 予後に関して収集するデータ

最終観察日、最終観察時の血清クレアチニン値、観察終了の理由、死因、透析導入(日)、心血管イベント(日、内容)

5) 尿サンプルの収集に関するデータ

各施設において、観察時に尿サンプルを収集した際には、採取方法と保存条件を記載する。収集された尿サンプルは、各施設で保管することとした。

分科会:糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

本分科会では、より臨床の病態を反映する糖尿病性腎症病期分類への改訂にむけた具体的な提言案を提示するために、特に臨床的に頻度が高く、CKDステージ分類と糖尿病性腎症病期分類から病態・予後が十分理解されていない下記の症例の腎予後、総死亡、心血管イベントの解析を中心に行った。

- ①GFR60未満(CKDステージ分類3以上)で蛋白尿陰性及び微量アルブミン尿陰性例
- ②GFR60以上(CKDステージ分類1、2)で顕性蛋白尿例

本分科会の研究目的を達するために、平成21年度から1. 既存のコホートをを用いた多施設共同による事前登録前向き研究、2. 既報論文によるメタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例を用いて予後とその規定因子を検討してきた。平成23年度は、これらの解析データを元に、糖尿病性腎症病期分類への改訂にむけた具体的な提言案を作成した。

分科会:糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発

1) 分科会全体研究

平成23年度は、既報の糖尿病性腎症の尿バイオマーカーとして、CCN2, Collagen IV, Angiotensinogen (AGT), MCP-1, L-FABP を最終候補として選定し、それぞれの特異抗体を購入し、これら5種類のバイオマーカーの測定を開始した。測定には、名古屋大学糖尿病尿サンプル252症例及びJDN-CSレジストリーの尿サンプル16症例(境界型・1期-4期)を用いた。

微小化学分析システム(μ TAS)を応用した次世代型の臨床用バイオマーカー測定装置の開発については、多数ある μ TASの中から本研究目的に最適な分析プラットフォームの選定と、選定した μ TASを用いた患者尿サンプルの測定についてモデルバイオマーカーを用いたフィジビリティスタディに着手した。すなわち、本研究

で求められる μ TAS のスペックとして、複数のバイオマーカーを測定可能であること、微量な尿サンプルで測定可能であること、尿中の微量なバイオマーカーを検出可能な感度を有すること、臨床への応用展開を踏まえて簡便かつ安価な装置であること、などが挙げられる。このような観点から複数の μ TAS を比較検討した結果、名古屋大学工学部の渡慶次学准教授が開発した流路型免疫分析チップが最適であると判断した。この流路型免疫分析チップの特徴には、微量サンプル（1 バイオマーカーあたり $0.7 \mu\text{l}$ ）で、高速分析（1 アッセイあたり 10 分間以下）が可能で、 μ TAS に尿サンプルや分析試薬を送り込むための機器装置が不要で、使い捨てのスライドグラス型 μ TAS とその検出装置のみで、従来の 96 穴プレートによる ELISA 分析と同等かそれ以上の検出感度でマルチバイオマーカーのアッセイが可能であることが挙げられる。しかも、該流路型分析チップのコストは一枚当たり千円程度で、使用する抗体や試薬も極微量で済むため、バイオマーカーの分析に係る総コストを低く抑えることが可能になる。

現在 1 種類のマーカーを用いた流路型分析チップが終了し、5 種類のマーカーを同時測定するシステムに移行中である。さらに、従来の ELISA 分析とデータの検証を行い、5 種類のマーカーを用いたパネルモデルを作成中である。

2) 個別研究

①メタボローム解析；名古屋大学で収集した糖尿病性腎症各ステージの患者尿サンプルを用いて尿中代謝産物の一斉解析に着手し、その第一段階として患者尿サンプルのメタボローム解析法の分析プロトコルの確立を開始した。

②エクソゾーム解析；進行性の腎疾患においては、尿中にポドサイトが脱落することが知られており、この脱落ポドサイトのカウントによる評価はなされているが、元の腎疾患の診断に用いることはできない。本研究では、病態の明確な動物

モデルおよび実際の腎生検で確定診断のついたヒトのさまざまな腎疾患において尿中エクソゾームタンパクを抽出し、その解析によって、ポドサイト障害の詳細を分子レベルで明らかにし、腎疾患の非侵襲的診断法を開発する。

③血液を用いた糖尿病病態診断の試み；PBMCの遺伝子発現プロファイルから、糖尿病と心筋梗塞、ストレス、加齢、概日リズムの乱れ等の病態診断への応用を目指した解析を行った。また、2型糖尿病患者5名と健常者5名の肝臓における発現遺伝子をSAGE法を用いて包括的に解析し、糖尿病患者で1.5倍以上発現亢進する分泌タンパクコード遺伝子63種、発現低下する遺伝子114種を同定した。DNA chip法を用いてこれらの遺伝子群の肝発現レベルと患者の臨床背景を照合した結果、肝遺伝子発現量がHbA1c値と相関する遺伝子14種、BMIと相関する遺伝子22種、HOMA-IRと相関する遺伝子14種、グルコースクランプ法で評価したインスリン感受性指数MCRと相関する遺伝子15種を同定した。

分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発

①カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果

2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスに、摂餌中にレスベラトロールを0.3%添加して8週間飼育した。その後、代謝マーカー、尿アルブミン量、腎組織検査、酸化ストレス、Mn-SOD活性と発現量を検討した。さらに、2型糖尿病ラットにカロリー制限を行い、ミトコンドリア形態異常、腎障害の改善を検討した。

②骨髄由来細胞に作用するケモカイン受容体阻害薬の検討

本研究では、自然発症2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスを用い、対照マウスとしてdb/+マウスを用いた。CCR2阻害薬としては、これまでに1型糖尿病モデルマウスおよび試験管内の検討の際に使用したプロパゲルマニウム(PG)を用いた。PGまたは対照薬投与16週間後にと殺し腎組織

を得た。検討項目として、腎におけるCD45⁺/Col1⁺細胞ならびにF4/80陽性マクロファージ数に加え、糸球体硬化・間質線維化およびそれに関連する分子群を評価した。さらに、腎機能およびアルブミン尿を検討した。

③糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討

SDラットにストレプトゾトシンを投与し、1週、2週、8週の時点で腎臓を摘出し、免疫組織化学にてMTの発現変化を検討した。また腎臓における局在を明らかにするため、内皮細胞、ポドサイトや尿細管上皮細胞などに対する抗体と二重染色を行った。

④AGEs-DNA aptamerによる糖尿病性腎症進展抑制の可能性

AGEs-aptamerとAGEとの結合をQCM法にて確認する。さらにaptamerにKK-Ay/Taマウスと、そのコントロールであるC57BL/6jマウスを腎障害、尿中albuminが出現すると思われる16週令まで観察する。AGEs-aptamerを8週令のマウスに浸透圧ポンプにて持続的に投与し、16週まで観察しsacrificeした。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、ヘルシンキ宣言および文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」および文部科学省の「疫学研究に関する倫理指針」を遵守している。遺伝子発現検索に用いる末梢血液サンプルは、医学研究目的に用いられることについて同意を得た対象者より採取し、連結可能匿名化後に保存する。また、観察研究および臨床研究においては各研究の分担研究者は、臨床研究のプロトコルを作成し、各施設の臨床研究倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

本研究を通じて、尿検体収集を伴う本レジストリーは、日本腎臓学会腎臓病総合レジストリーの二次研究として構築された。

本研究計画は、平成21年7月に金沢大学倫理委員会にて承認された。研究計画書等は、日本腎臓学会のホームページに掲載し、本研究班の分担研究者および協力研究者の施設を中心に各施設の倫理委員会の承認を得て、登録を開始した。また、平成22年6月には、日本腎臓学会の倫理委員会においても承認され、独自に倫理委員会の組織を持たない、日本腎臓学会会員の施設においても、本レジストリーの登録に参加できる状況となった。

一次研究としての腎臓病総合レジストリーにおける糖尿病性腎症関連の組織診断確定例（Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR) 登録例）は、平成23年11月末現在、614例が登録、抽出された。一方、本レジストリー（JDN-CS）には、平成23年12月末現在、14施設から420例（男性269例、女性151例、平均年齢65.4±10.7歳）の登録が行われた。腎生検施行例は15例であった。また、尿検体収集例は228例であった（図1）。

図1 登録時患者背景

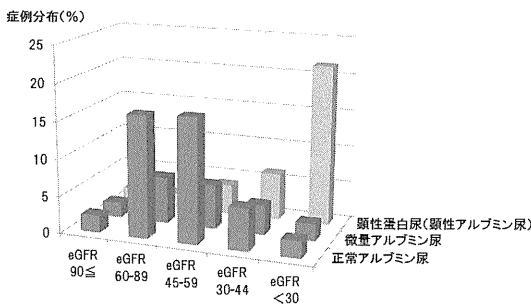
▶ 性別	(420例)	男性 269 例, 女性 151 例
▶ 腎生検施行		15 例
▶ 尿検体収集		228 例
▶ 年齢	(420例)	65.4±10.7 歳 (23-93)
▶ 糖尿病罹病期間	(326例)	14.6±10.2 年 (1-50)
▶ BMI	(383例)	24.9±4.2 (15.0-39.9)
▶ 収縮期血圧	(391例)	130.8±17.6 mmHg (80-185)
▶ 拡張期血圧	(408例)	73.1±11.3 mmHg (46-110)

登録症例の内訳は、腎症前期から顕性腎症まで幅広い病期の症例が登録されていることが確認された（図2、図3）。

図2 登録時血液検査所見

▶ 血清クレアチニン値	(404例)	1.4±1.3 mg/dl	(0.4-11.5)
▶ 血清総蛋白値	(397例)	6.9±0.8 g/dl	(4.3-8.9)
▶ 血清アルブミン値	(387例)	3.9±0.6 g/dl	(1.4-5.0)
▶ 総コレステロール値	(340例)	184.2±44.4 mg/dl	(65-370)
▶ LDLコレステロール値	(359例)	100.8±33.1 mg/dl	(23-263)
▶ HDLコレステロール値	(389例)	52.1±17.6 mg/dl	(21-160)
▶ 中性脂肪値	(407例)	141.2±90.6 mg/dl	(36-799)
▶ 血糖値	(409例)	149.4±59.7 mg/dl	(55-431)
▶ ヘモグロビンA1c値	(403例)	6.8±1.4 %	(4.2-13.5)
▶ ヘモグロビン値	(410例)	12.7±2.1 g/dl	(6.2-19.1)

図3 登録時のアルブミン(蛋白)尿とeGFRによる症例分布



本レジストリーでは、定期的な経過観察を行う計画となっており、214例の経時データが登録された。登録時データと1年後データの比較では、収縮期血圧の上昇とヘモグロビンA1c値の低下を認めた。1年後の時点では、尿アルブミン(蛋白)や腎機能には変化を認めなかった(図4、図5)。

図4 1年後の追跡データ:収縮期血圧の上昇を認めた

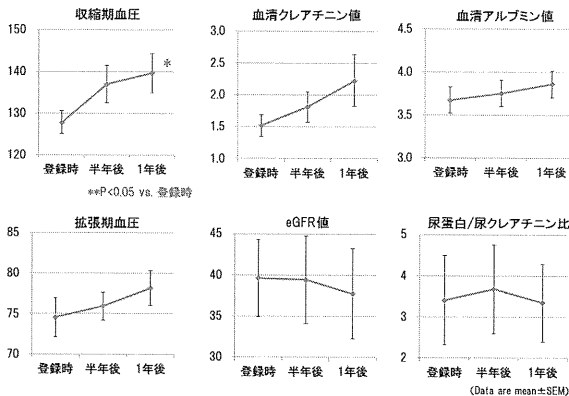
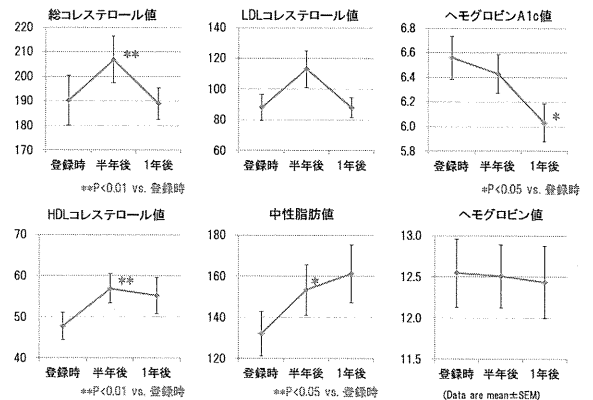


図5 1年後の追跡データ:ヘモグロビンA1c値の低下を認めた



現在も、腎臓学会のホームページや毎月発行するニュースレターにより、登録促進を進めている。今後も症例登録、データの集積を継続し、本邦の糖尿病性腎症の病態解析、予後評価を行う予定である。このレジストリーは臨床的、疫学的ならびに病理学的な研究と密接に連関させ推進するものとする。特に、腎生検施行例を含めてレジストリー登録例の尿検体を用いたバイオマーカーの validation を行う。

分科会:糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

平成23年度には、これまで検討されてきた解析結果を基に、以下の様な改訂に向けた提言案を作成した。

はじめに、糖尿病性腎症の病期分類の改訂にむけた提言案を示し、ついでその根拠となった、1. 既存のコホートをを用いた多施設共同による事前登録前向き研究、2. 既報論文によるメタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例の予後解析の結果を示す。

より病態を反映した本邦の糖尿病性腎症病期分類の改訂にむけて、これまでの背景ならびに本研究から得られた提言を示す。

- ① 糖尿病性腎症病期分類は、すべての糖尿病性腎症症例が分類されるように配慮する。
- ② CKDステージ分類と整合性をとることが求められる。
- ③ アルブミン・蛋白尿ならびに腎機能は、

予後を規定する因子であり、病期分類の基本として用いる。

- ④ 腎予後、心血管病変、総死亡を反映する必要がある。

上記提言を鑑み、事前登録前向き試験、臨床病理学的検討、メタ解析の結果から、本研究班として糖尿病性腎症病期分類の改定案2案を提言する（表1）。

表1 糖尿病性腎症病期分類の改訂提言案

案1

		GFR もしくは CCr (ml/min/1.73m ²)					
		>90	60-89	45-59	30-44	15-29	<15
尿アルブミン定量 尿アルブミン/Cr比 (mg/gCr)	正常 <30						
	微量アルブミン尿 30-299						
	顕性蛋白尿 (顕性アルブミン尿) >300						

注1) 糖尿病例では尿アルブミン測定が推奨される。
注2) GFRとして日本腎臓学会の推算GFR(eGFR)を用いても良い。
注3) Crclは体表面積にて補正したものをを用いる。

案2

		GFR もしくは CCr (ml/min/1.73m ²)			
		>60	30-59	<30	
尿アルブミン定量 尿アルブミン/Cr比 (mg/gCr)	正常 <30	1期		4期	5期 (透析療法期)
	微量アルブミン尿 30-299	2期			
	顕性蛋白尿 (顕性アルブミン尿) >300	3A期	3B期		

注1) 糖尿病例では尿アルブミン測定が推奨される。
注2) GFRとして日本腎臓学会の推算GFR(eGFR)を用いても良い。
注3) Crclは体表面積にて補正したものをを用いる。

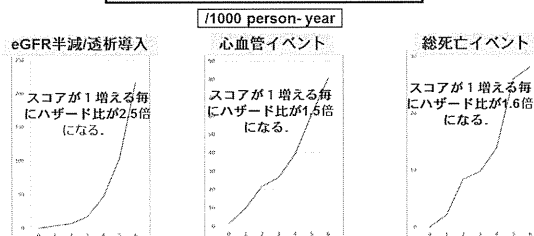
さらに、今後解決すべき課題として、以下に提言する。

- ① 早期腎症の診断には、アルブミン尿に加えて、病態を的確に示すバイオマーカーが必要である。
- ② この新規バイオマーカーの検討に際して、本研究班で収集された尿検体を用いてvalidationを行うことができる。
- ③ 病理学的検討により、本邦の腎症の病態評価を行う必要がある。
- ④ 腎機能低下例では、血尿を認めることを記載する。ただし、他の腎臓病、悪性疾患の鑑別を充分に行う必要がある。
- ⑤ 予後は現在進行中の前向きコホート研究(JDCP, JDN-CSなど)の結果も反映させる。
- ⑥ 各病期における介入試験、食事療法などエビデンスに基付いた治療法の記載が必要である。

- ⑦ 国際的な比較・報告・検証も含めて、本邦の病期分類の妥当性を検証する必要がある。
- ⑧ 下記に示すように、予後予測のためのスコアリングを導入することも考慮する(図6)。

図6 臨床的重み付けを加味した予後を反映するスコアリング化(案)

項目	スコア
尿アルブミン(30以上)	1
尿アルブミン(300以上)	2
eGFR 45以下	1
60歳以上	1
sBP130以上	1
HbA1c (JDS値) 6.5以上	1



次いで、この提言案の根拠となった3つ

の研究成果を以下に示す。

1) 事前登録前向き研究

全国的な大規模コホートの協力を得て、10のコホートから4814例の症例登録を得た(表2)。主要評価項目は、1.経時的なeGFRの低下あるいは透析導入、2.個体死、3. 心血管イベントの3項目とした。

なお、各々のイベントの定義を以下に示す。虚血性心疾患は、典型的な症状、心電図異常、および血液検査により心筋逸脱酵素の上昇を示すものとする。また、PCI(経皮的冠動脈インターベンション)、あるいはCABG(冠動脈バイパス術)のいずれかを施行した場合も含む。

脳梗塞は、急速に発症し、身体所見を伴った神経学的異常が、24時間以上持続するものとする。(症状が無く、CTやMRIと言った画像のみで指摘された異常は含めない)

脳出血は、身体所見を伴った神経学的異常を認め、画像所見にて脳出血を診断されたものとする。

腎イベントとしては、eGFRの半減もしくは透析の導入とする。

表2 事前登録前向き試験：登録施設と症例

施設名	症例数	アルブミン尿が測定された4355例	
東京女子医大	1486	平均観察期間	6.5年
横山内科クリニック	1002	平均年齢	60.2歳
琉球大学	867	登録時	Cr0.8/eGFR75.6
滋賀医大	598	腎イベント	420例
九州大学	230	心血管イベント	610例
虎の門病院	225	総死亡	237例
金沢大学	173		
金沢医療センター	139		
新潟大学	75		
奈良県立医大	19		
合計	4814		

年齢18歳以上、生存について最低1年間フォローされていて登録時とアルブミン尿が測定されている方を対象とした

このうち、18歳以上かつ最低1年間経過観察されており、登録時に血清クレアチニン値ならびに尿アルブミンが測定されている4355例を対象にして詳細な解析を行った。なお、その際の腎イベント、心血管イベントならびに総死亡数を母集団となる症例数とともに示す(表2-4)。

表3 患者背景

年齢(年;平均[標準偏差])	60.2 (11.6)
男性(人 [%])	2559 (58.8)
腎機能関連	
尿アルブミン(mg/g-Cr;中央値[四分位範囲])	18.2 (8.5 to 66.3)
<30(人 [%])	2698 (62.0)
30 to 300(人 [%])	1123 (25.8)
>300(人 [%])	534 (12.3)
eGFR(ml/min/1.73m ² ;中央値[四分位範囲])	75.6 (60.1 to 92.1)
eGFR ≥90(人 [%])	1204 (27.6)
eGFR 60 to 89(人 [%])	2069 (47.5)
eGFR 45 to 59(人 [%])	647 (14.9)
eGFR 30 to 44(人 [%])	312 (7.2)
eGFR <30(人 [%])	123 (2.8)
血圧(mmHg)	
収縮期血圧(平均[標準偏差])	130.9 (18.6)
拡張期血圧(平均[標準偏差])	74.3 (18.0)
その他のリスク因子	
HbA1c(%;平均[標準偏差])	7.6 (1.7)
総コレステロール(mg/dL;平均[標準偏差])	205.1 (36.0)
BMI(kg/m ² ;平均[標準偏差])	25.2 (4.2)

表4 イベントをおこした症例数

		eGFR					
		~90	90~60	60~45	45~30	30~	
腎イベント	アルブミン尿 <30	59	4	3	1		
	30< 300	31	42	15	10	1	
	300<	20	62	56	54	63	
解析対象となった症例の内訳	アルブミン尿 <30	2226	348	109	15		
	30< 300	297	535	176	101	14	
	300<	65	150	123	102	94	
総死亡	アルブミン尿 <30	70	26	4	4		
	30< 300	11	33	13	5	6	
	300<	6	13	19	13	14	
心血管イベント	アルブミン尿 <30	232	40	14	1		
	30< 300	31	97	33	28	2	
	300<	7	41	30	30	24	

死因
アルブミン尿30未満で、GFR30未満の症例：2例が感染症、2例が不明
アルブミン尿30-300で、GFR30未満の症例心血管イベント2名、癌2名、感染症1名、不明1名

事前登録前向き研究は予後を中心に解析し、その規定因子を同定した。その結果、

- ① 3つの予後、すなわち腎イベント、心血管イベントならびに総死亡のいずれも、正常アルブミン尿に比べて微量アルブミン尿、顕性蛋白尿に進展するにつれてその予後が不良となった(表5)。

表5 アルブミン尿・蛋白尿は腎イベント・心血管イベント・総死亡の危険因子である

腎イベント		心血管イベント	
	eGFR 規定無し		eGFR 規定無し
正常アルブミン尿	Ref	正常アルブミン尿	Ref
微量アルブミン尿	3.6 *	微量アルブミン尿	1.4 *
顕性蛋白尿	23.4 *	顕性蛋白尿	2.1 *
総死亡			
	eGFR 規定無し		
正常アルブミン尿	Ref		
微量アルブミン尿	1.3		
顕性蛋白尿	3.4 *		

*: p<0.05

- ② 乖離例のうち、正常アルブミン尿かつ腎機能低下例は腎イベント、心血管イベ

ントとも有意な増悪はみられなかった。ただし、総死亡数の増加が観察された(表6)。

表6 顕性蛋白尿群において腎機能低下により腎イベントが増加する

	腎イベント					心血管イベント				
	eGFR ≥90	eGFR ≥60	eGFR ≥45	eGFR ≥30	eGFR <30	eGFR ≥90	eGFR ≥60	eGFR ≥45	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref		0.7	1.7	6.0	Ref		1.0	1.4	0.4
微量アルブミン尿	4.0*	3.2*	3.9*	3.8*	5.8	1.1	1.5*	1.4	2.0*	0.6
顕性蛋白尿	16.4*	17.1*	33.3*	12.7*	81.7*	1.5	2.3*	1.9*	2.4*	2.0*

*: p<0.05

総死亡					
	eGFR ≥90	eGFR ≥60	eGFR ≥45	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref		1.6	1.2	7.6*
微量アルブミン尿	1.6	1.5*	1.3	0.9	9.3*
顕性蛋白尿	9.2*	2.2*	4.9*	4.0*	5.9

死因
アルブミン尿30未満で、GFR30未満の症例：2例が感染症、2例が不明
アルブミン尿30-300で、GFR30未満の症例：心血管イベント2名、脳卒中1名、不明1名

③ さらに、顕性蛋白尿を示しながら腎機能が保持されている乖離例はいずれもイベント数の増加がみられた(表6-7)。

④ 腎機能低下かつ顕性蛋白尿を示す症例では腎イベントのリスクが増大した(表6-7)。

表7 顕性蛋白尿群において腎機能低下により腎イベントが増加する

	腎イベント			心血管イベント		
	eGFR ≥60	eGFR ≥30	eGFR <30	eGFR ≥60	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref*			Ref		
微量アルブミン尿	3.7		62.1*			1.4
顕性蛋白尿	16.1*	33.9*		2.0*	2.0*	

*: p<0.05

総死亡			
	eGFR ≥60	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref		
微量アルブミン尿	1.3		5.9*
顕性蛋白尿	2.5*	4.2*	

2) 既報論文のメタ解析では、MEDLINE、EMBASE、CINAHL を用いて、コホート研究論文を対象とした。主なキーワードは糖尿病性腎症・腎機能・心血管障害・総死亡とした。スクリーニングは2名の査読者が独立して行った。相対危険(RR)の統合にはランダム効果モデルを用いた。乖離例である正常アルブミン尿かつ GFR 60 未満例は腎症進行、心血管死は有意な危険因子とならなかった。いずれのアウトカムにおいても、微量アルブミン尿・顕性蛋白尿は正常アルブミン尿群と比較してリスクが上昇した。各アウトカムにおいて、腎機能低下はアルブミン尿に合併した場

合にリスクの増悪要因となった(表8)。

3) 長期観察可能な腎生検施行症例の検討では、腎生検により糖尿病性腎症と診断され長期観察された2型糖尿病260例を対象に、臨床・病理学的特徴と予後との関連を検討した。

顕性蛋白尿は、腎予後、心血管系疾患発症、生命予後に最も影響を及ぼす因子であった(図7、表9)。一方、eGFR 低下の影響は、微量アルブミン尿例と顕性蛋白尿例の腎予後ならびに顕性蛋白尿例の心血管系疾患発症と生命予後において認められた。また、腎機能低下例、顕性蛋白尿例では、血尿を認めることも確認された。

正常アルブミン尿の腎機能低下(eGFR 60mL/分/1.73m²未満)例は、腎機能保持例と比較して高齢であり、びまん性病変・間質病変・血管病変が高度であった。

顕性蛋白尿例は、腎機能が保持されていても糸球体病変、間質線維化、動脈硬化が高度であり、腎機能低下例は間質病変がより高度であった。さらに病理学的予後規定因子として表9に示すものがあがった。

図7 透析導入/eGFR半減：蛋白尿が重要である

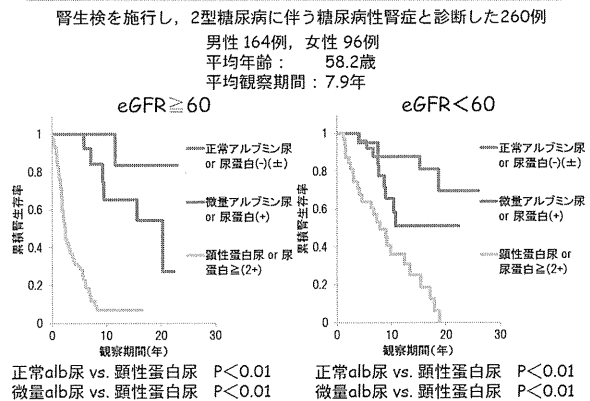


表8 アルブミン尿・蛋白尿は腎症進行・心血管死に対する危険因子である

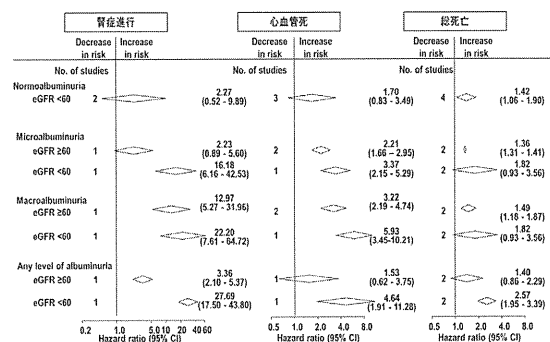


表9 顕性蛋白尿は、腎予後に最も影響する因子である

＜腎予後不良に関連する臨床因子＞		
顕性蛋白尿	HR 13.6	(95%CI 5.16-35.59)
アルブミン尿	HR 2.93	(95%CI 1.05-8.18)
糖尿病性網膜症	HR 2.67	(95%CI 1.18-6.04)
貧血	HR 1.44	(95%CI 1.28-1.63)
低年齢	HR 1.03	(95%CI 1.01-1.06)
eGFR低値	HR 1.02	(95%CI 1.00-1.03)
収縮期血圧高値	HR 1.01	(95%CI 1.00-1.02)
＜腎予後不良に関連する病理因子＞		
動脈硬化	HR 1.81	(95%CI 1.25-2.61)
結節性病変	HR 1.77	(95%CI 1.24-2.52)
滲出性病変	HR 1.71	(95%CI 1.15-2.55)
間質線維化・尿細管萎縮	HR 1.67	(95%CI 1.23-2.25)
メサングウム融解	HR 1.65	(95%CI 1.02-2.67)
びまん性病変	HR 1.46	(95%CI 1.08-1.98)

分科会：糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発

1) 分科会全体研究

1) 平成 21 年度及び 22 年度には、ヘルシンキ宣言および各省庁よりの倫理指針に基づいて末梢血液および尿サンプル採集のための臨床研究プロトコルを作成し、臨床研究倫理委員会の承認を受け、本年度には、これまでの基礎検討および収集検体を用いた以下の様な具体的な測定が行われた。

2) 尿中ではCCN2、Collagen IV、AGT、MCP-1、L-FABPを、応用可能で簡便・高精度・高再現性なバイオマーカー候補として選定した。測定したバイオマーカーと各種臨床パラメーターとの相関は、；

L-FABP：血清Cr ($R^2:0.7694$)、尿中アルブミン ($R^2:0.6640$)、 ΔCr ($R^2:0.8139$)

MCP-1：尿中アルブミン ($R^2:0.7259$) AGT、ColIV： ΔCr ($R^2:AGT 0.6254$ 、ColIV 0.5037)

腎機能低下 (ΔCr) に関する各マーカーのROC 解析： $(\Delta Cr/M>0.0003)$

背景因子：男性 (AUC:0.710)、CKD stage (AUC:0.670)、血清Cr (AUC:0.786) アルブミン尿 (AUC:0.689)

尿中マーカー：L-FABP (AUC:0.664)、MCP-1 (AUC:0.618)、AGT (AUC:0.618)、CTGF (AUC:0.521)、CollagenIV (AUC:0.664)

であった。

流路型免疫分析チップ(名古屋大学工学部渡慶次学准教授)を用いた、糖尿病性腎症尿中バイオマーカー開発用の分析プラットフォーム (CCN2、Collagen IV、AGT、MCP-1、L-FABP) の確立に関しては、尿サンプルに最適化した測定条件の検証を続けている。さらに、すでに本レジストリーで収集された尿検体を用いて、既知、新規バイオマーカー候補の validation を行っている。

2) 個別研究

①メタボローム解析

名古屋大学のコホートの患者尿サンプルを用いて尿中代謝産物の一斉解析に着手し、その第1段階として患者血液サンプルのメタボローム解析法の分析プロトコルの確立を目指した。具体的には、キャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) を用いて患者血液中の代謝産物の測定を行った。糖尿病性腎症に特異的な 11 個の代謝物を発見した。さらにこの中の 8 代謝物が eGFR とよく相関し、1 代謝物は腎機能の低下とともに減少する新しいタイプのマーカーである。

尿サンプルを用いたメタボローム解析の結果、同定可能な代謝物は、cation: 91 物質、anion: 79 物質、計 170 物質であった。

尿中アルブミンと負の相関を示す 3 代謝物 (cation: 2、anion: 1)、正の相関を示す 1 代謝物 (anion) を同定した。eGFR と負の相関を示す 2 代謝物 (cation)、正の相関を示す 6 代謝物 (cation: 3、anion: 3) を同定した。

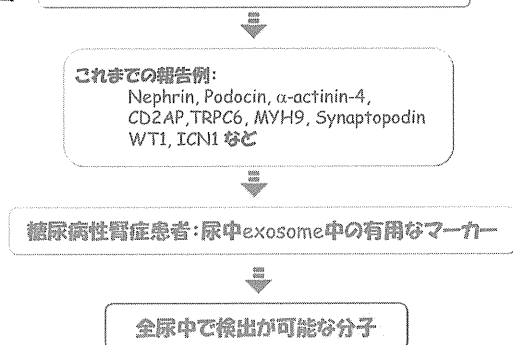
複数を組み合わせた腎予後推定パネル作成を目指している(特許の関連で詳細は省略)

②クソゾーム解析

腎生検で確定診断のついた糖尿病性腎症患者の尿より、尿中exosomeを採取し、腎機能低下に強くリンクした候補マーカーの探索を行い、ポドサイト由来のexosome中候補タンパク質を得ている。こ

のうち、全尿から直接、またキット化による間接測定法を順次樹立し、外来で得られる少量の随時尿を用いての検出を可能とした。また、各種治療によって、その測定値が変化しており、効果判定に用いる可能性を確認した (図8)。

図8 腎機能低下に強くリンクした候補マーカーの探索



③血液を用いた糖尿病病態診断の試み

BMCの遺伝子パスイテ発現異常と病態との関連の解析から、糖尿病の重症度マーカーとしてJNK経路を、糖尿病の発症予知マーカーとしてOXPHOS経路を同定した。OXPHOS経路は糖尿病患者で健常者に比し協調的に発現低下しており、血糖コントロールによっても改善しない。この仮説を追跡コホート研究で検証中である。

また、肝臓における検討では、

1. 肝遺伝子発現がMCRと負に相関し、かつ糖負荷後120分血糖値と正に相関したセレノプロテインP (SeP)を精製した。
2. 2型糖尿病モデル動物KKAyマウス、OLETFラットでは、肝SeP遺伝子、血中SePタンパクが上昇していた。
3. 2型糖尿病患者31名で血中SeP濃度を測定した結果、血糖値、HbA1c値と有意な正相関を認めた。
4. C57BLマウスに1mg/kgの精製SePを前投与すると、糖負荷30分後の血糖値は約1.8倍に上昇し (p=0.001)、腹腔内インスリン負荷後30分の血糖降下率は約10%減弱した。
5. このマウスの肝と筋でインスリン刺激性Aktリン酸化は減弱していた。
6. SePノックアウトマウスは体重、摂食量、酸素消費量は正常であったが、糖およびインスリン負荷試験では耐糖能、インス

リン感受性は良好であった。

7. SePノックアウトマウスの肝と筋ではインスリン刺激によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化が亢進していた。
8. H4IIEC肝細胞をSePタンパク10 μg/mLで12時間前処置すると、1ng/mlのインスリン15分刺激によるinsulin receptor、IRS-2、Aktのリン酸化はそれぞれ約40%に減少した。このとき培養液中への糖放出は約30%増加した。
9. インスリン抵抗性関連既知因子の発現を同細胞で網羅的に検討した結果、SeP投与細胞ではAMPKのリン酸化とその下流のACCのリン酸化が減弱していた。
10. AMPKの下流で制御される脂肪酸酸化関連遺伝子群 (PPAR-α、Cpt-1、Acad1)の発現も減弱した。
11. SePタンパク投与H4肝細胞では、C-14-oleateのC-14-CO₂へのベータ酸化も低下していた。
12. 精製SePタンパク1 mg/kgBWをC57BLマウスに静脈投与し、6時間後に肝臓を摘出しタンパク発現を検討したところ、AMPKおよびACCのリン酸化は有意に低下していた。
13. Dominant negative α AMPKをコードするアデノウイルスを感染させたH4細胞では、SeP投与によるインスリン抵抗性誘導作用はほぼ消失した。
14. SeP投与でも細胞内AMP、ATP濃度には変化はなかった。

SeP投与細胞では、AMPKリン酸化を負に制御するプロテインフォスファターゼ2C (PP2C)のタンパク発現が亢進していた。一方、AMPKKであるLKB1、CaMKK betaの総タンパク発現量に差はなかった。

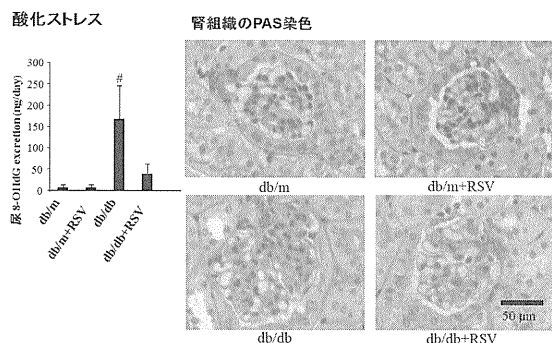
分科会:糖尿病性腎症の新規治療法の開発

①カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病腎症の改善効果

2型糖尿病性腎症モデルマウスにレスベラトロールを投与して、代謝マーカー、腎組織病変、酸化ストレス、およびMn-SODに対する効果を非投与群と比較検討した。

レスベラトロール投与によって、血糖、脂質異常の改善とともに、尿アルブミン排泄の減少、酸化ストレスの抑制(尿中8-OHdG)、組織所見の改善がみられた。その分子機構として、糖尿病状態におけるミトコンドリア Mn-SOD の活性低下を、レスベラトロールが改善することを見出した(図9)。

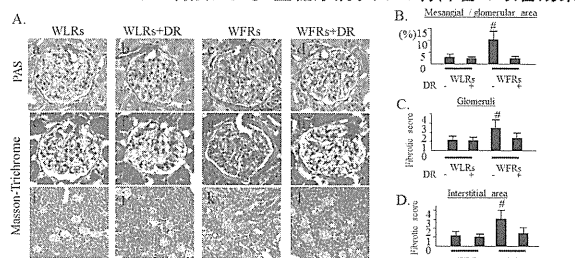
図9 レスベラトロール(RSV)によって、2型糖尿病db/dbマウスの尿中8-OHdG 排泄量とメサンギウム領域の拡大は改善される



Kitada M et al. Diabetes 2011

さらに、2型糖尿病ラットにカロリー制限を行うと、腎臓における p62Sqtst 過剰発現の改善とともに、ミトコンドリア機能、腎障害の改善がみられた(図10)。

図10 40%カロリー制限による2型糖尿病ラットの腎障害の改善効果



(A-a through d) Representative photomicrographs of PAS-stained kidney sections from four groups of rats. Data are the results of independent experiments in each group with six rats per group. Original magnification, x400.
(B) Quantitative assessment of the mesangial matrix area in the four groups of rats. Data are means±SD. (n=6, #P<0.01 vs other groups).
(A-e through h, i through l) Representative photomicrographs of Masson-Trichrome staining in the four groups of rats. Data are the results of independent experiments in each group with six rats per group. Original magnification, x400 for glomerular fibrosis and x100 for interstitial fibrosis.
(C and D) Quantitative assessment of fibrosis in the four groups of rats. Data are means±SD. (n=6, #P<0.01 vs other groups).

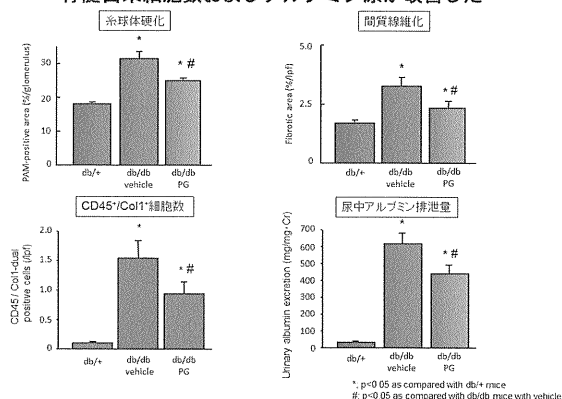
Kitada M et al. Exp Diabetes Res. 2011;20(11):908-185.

②骨髄由来細胞に作用するケモカイン受容体阻害薬の検討

コンピュータ画像解析により算出した糸球体硬化率および間質線維化率は、PG非投与群に比してPG投与群で低下した。CD45および1型コラーゲンの二重陽性細胞として同定したCD45+/Col1+細胞は主として腎間質に浸潤し、その数はPG非投与群に比してPG投与群で低下した(図11)。腎内マクロファージ数も糸球体・間質ともにCD45+/Col1+細胞数と同様の結

果であった。また、1型コラーゲン、TGF-β1ならにMCP-1といった線維化に関連する分子発現もPG非投与群に比してPG投与群で低下した。両群間の腎機能に差はみられなかったが、PG投与群ではPG非投与群に比して、アルブミン尿が改善した(図11)。

図11 CCR2阻害により、糸球体硬化・間質線維化、骨髄由来細胞数およびアルブミン尿が改善した



*, p<0.05 as compared with db/+ mice
#, p<0.05 as compared with db/db mice with vehicle

③糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討

コントロールラットでは腎臓にMTの発現をほとんど認めないが、糖尿病ラットでは近位尿細管上皮細胞にMT発現が増強することを確認した。さらに、マウス培養近位尿細管上皮細胞(mProx24)を用いた検討では、高糖濃度条件下において約1.5倍のメタロチオネイン発現を認めた。また、ビタミンEは高糖濃度条件下において用量依存的にMT発現を抑制した。

④AGEs-DNA aptamerによる糖尿病性腎症進展抑制の可能性

AGEs-aptamerの投与により、2型糖尿病モデルであるKKAY/TaマウスにおけるAGEの糸球体への蓄積、尿中アルブミン排泄、腎機能障害は有意に改善した。さらに、PAS染色、マッソントリクローム染色における評価では、糖尿病由来メサンギウム基質の増加、糸球体肥大はAGEs-aptamerにより完全に抑制された。酸化ストレスの指標である尿中8-OHdGは糖尿病群にて増加していたが、AGEs-aptamer投与により有意に改善した。

なお、上記の成果は当初の予定通り、アウ

トリーチにて情報の発信を積極的に行った。特に、日本腎臓学会公開セッション、日本糖尿病学会、2回の市民公開講座にて情報を発信し、積極的に論文作成を行っている。

D. 考察

全体研究

糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

本研究の取り組みにより、尿検体の保存を含み、長期経過観察が可能な、本邦の糖尿病性腎症レジストリーが構築された。

症例登録は、当初の予定通り、腎症前期から顕性腎症にいたる幅広い病期の糖尿病性腎症の実態を把握する形で進められた。また、尿検体の保存も各施設で着々と進められた。このレジストリーの取組みを通じて、病態解明、予後改善や有効な治療法開発に向けた総合的なシステムの構築につながる可能性がある。今後も症例登録、データの集積を継続し、日本腎臓学会、関連学会と密接に連携し、本邦の糖尿病性腎症の病態解析、予後評価を行う予定である。

さらに、本レジストリーで収集された尿検体を用いて、既知、新規バイオマーカー候補の validation をすでに行っている。このように、当初のレジストリー構築の目的である予後が判明した検体を用いた validation も順調に進行している。

分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

糖尿病性腎症の病態・予後を反映する病期分類を目指し、本邦を代表するコホートが参加した解析を進めることができた。すでに4814例の登録がえられ、18歳以上かつ最低1年間経過観察された4355例の解析が進んでいる。これはこれまでにない規模かつ質の高い本邦のコホート研究が行われたと考えられる。さらに、メタ解析ならびに長期経過観察を行った本邦の腎生検施行例の予後とその規定因子の解析も当初の計画通り遂行でき、今回の改訂にむけた提言案ならびに今後の課題につき記

載することが可能であった。これらにより当初の本研究班の研究目的は達成できたものと考えられる。

平成24年6月までに改訂される日本腎臓学会によるCKD診療ガイドに本邦の改訂されたCKDステージ分類が掲載される予定である。臨床における混乱を最小限にするためにも、糖尿病性腎症病期分類との整合性について、今後も議論が求められる。

また、事前登録前向き試験、腎生検施行例での検討においても透析に導入された症例数に限りがあり、透析導入のみに関する予後を十分にエビデンスとして評価することができなかった。しかし、糖尿病性腎症の病期分類の改訂にむけた提言案には透析療法期（5期）の記載も含めた。これは現行の病期分類でも記載されており、臨床における分類の汎用性や利便性等から考慮した。

分科会：糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発

全体研究

多因子疾患・多臓器疾患の代表的な疾患である糖尿病性腎症の早期診断・予後推測を可能とするためには、多因子性病態形成メカニズムの解明と多因子性病態形成メカニズムの解明が不可欠であり、この二つの特徴（多因子・多臓器）を踏まえたマルチバイオマーカー診断技術の開発が必要となる。

本分科会の最終目標は、バイオマーカーのソースを尿に絞り込み、既存のマーカーに加え、現在網羅的に検索中のマーカー群から有望な候補を絞り込み、糖尿病性腎症の予防・治療に貢献可能なパネル化モデルの提唱を行うことである。

同時に、この成果を一般臨床に広く応用させるためには、低コスト・ハイスループットなマルチバイオマーカー測定系が必要となるため、この技術開発も合わせて行っていく予定である。

個別研究